基于 16SrDNA 测序探索食管鳞癌患者肠道菌群特征

张玉双，孔令洋，管佳畅，等. 基于 16SrDNA 测序探索食管鳞癌患者肠道菌群特征［J］. 中国全科医学，2022. ［Epub ahead of print］. DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2022.0875

张玉双[1]，孔令洋[2]，管佳畅[1]，李建波[1]，王一然[2]，王瑜[2]，李晶[1,2*]

基金资助：国家自然科学基金项目“甘润濡养法改善食管癌微环境中巨噬细胞极化调控 Gas6/Axl 信号通路抑制转移的研究”（项目编号：81973761）；河北省省级科技计划资助“探索食管癌证候规律及有效方药的真实世界研究”（项目编号：223777122D）

1.050011 河北省石家庄市　河北医科大学第四医院中医科
2.050011 河北省石家庄市　河北医科大学中西医结合学院
*通讯作者：李晶，主任医师，博士生导师；E-mail: lijingtiger@126.com

【摘要】　**目的**　探索食管鳞状细胞癌患者肠道菌群基本特征。**方法**　纳入未经任何抗肿瘤治疗的食管鳞状细胞癌患者 35 例作为食管癌组（EC 组），健康志愿者 35 例作为对照组（DZ 组）。收集两组人群粪便标本，应用 16S rDNA 技术检测肠道菌群，根据检测结果物种注释情况分析两组人群肠道菌群的 Alpha 多样性、Beta 多样性及差异菌群物种。**结果**　两组人群肠道菌群 Alpha 多样性香农指数（Shannon）、辛普森指数（Simpson）、Chao1 及 ACE 指数均无明显差异（$P<0.05$），而 Beta 多样性主坐标分析图（PCoA）显示两组样本整体上相距较远，物种结构存在差异。差异物种 t 检验结果显示，在属水平上与 DZ 相比，EC 组中栖粪杆菌属（Faecalibacterium）、罗斯氏菌属（Roseburia）、柠檬酸杆菌（Citrobacter）等丰度降低；罗姆布茨菌(Romboutsia)、瘤胃球菌属组（Ruminococcus_torques_group）、肠杆菌（Intestinibacter）、土杆菌属（Turicibacter）等的丰度升高（$P<0.05$）。LEfSe 分析显示，在属与种水平上与 DZ 组相比，EC 组中栖粪杆菌属（g-faeculibacterium）及普拉梭菌（s-faecalibacterium- prausnitzii)丰度明显降低；罗姆布茨菌（g-Romboutsia），s-Rombutsia-ilealis 丰度明显升高（$P<0.05$）。**结论**　食管鳞状细胞癌患者具有显著性差异肠菌，其中栖粪杆菌属、普拉梭菌、罗姆布茨菌属及 Rombutsia-ilealis 可能是食管癌特异性改变物种，与食管癌发生密切相关。

【关键词】　食管鳞状细胞癌，肠道菌群，16S rDNA 测序

Exploring the Characteristics of Gut Flora in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma Based on 16S rDNA Sequencing

ZHANG Yushuang[1], KONG Lingyang[2], GUAN Jiachang[1], LI Jianbo[1], WANG Yiran[2], WANG Yu[2], LI Jing[1,2*]
1. Department of Traditional Chinese Medicine,The Fourth Hospital of Hebei Medical University,Shijiazhuang 050011,China.
2. College of Integrated Chinese and Western Medicine,Hebei Medical University,Shijiazhuang 050011,China.
*Correspondence:LI Jing,President,Deputy Secretary,Department Director, Chief Physician,Professor,Doctoral supervisor;E-mail:lijingtiger@126.com

【Abstract】　**Objective**　To explore the basic characteristics of gut flora in patients with esophageal squamous cell carcinoma.**Methods**　35 patients with esophageal squamous cell carcinoma without any anti-tumor treatment were included as esophageal cancer group (EC group), and 35 healthy volunteers as control group (DZ group). Collected stool samples of two groups people,then used 16S rDNA technology to detect intestinal flora, analyze the alpha diversity,

beta diversity and differential flora species of the intestinal flora of two groups according to the species annotation of the test results. **Results** Shannon index, Simpson index, Chao1 index and ACE index of alpha diversity had no significant difference between the two groups (P<0.05), while principal coordinate analysis (PCoA) graph of the Beta diversity showed that the two groups were far apart on the whole, and the species results were different.T-test results of different species showed that the abundance of Faecalbacterium, Rosebria and Citrobacter in EC group decreased, while the abundance of Lactobacillus, Romboutsia, Ruminococcus_torques_group, Enterobacter and Turicibacter increased compared compare with DZ group at the genus level (P<0.05). LEfSe analysis showed that the abundance of g-faecalbacterium and s-faecalbacterium prausnitzii in EC group were significantly lower, and the abundance of g-Romboutsia and s-Romboutsia-ilealis increased significantly than that in DZ group at the genus and species levels(P<0.05).**Conclusion** Esophageal squamous cell carcinoma patients have significant differences in intestinal bacteria, among which faeculibacterium, faecalibacterium-prausnitzii,Rombutzia and Rombutsia-ilealis may be specific change species of esophageal cancer, which are closely related to the occurrence of esophageal cancer.

【Key words】 Esophageal squamous cell carcinoma;intestinal flora;16S rDNA sequencing

食管癌发病地域性差异明显，据最新统计我国食管癌发病与死亡均占全球食管癌总发病及死亡病例数的 50%以上，是世界平均水平的 2 倍以上[1-2]，河北省磁县、涉县是我国食管癌高发区。在我国食管鳞状细胞癌约占 90%以上[3],虽然早期行根治术后预后较好,但多数就诊时已无手术机会，这使我国食管癌 5 年生存率仅仅 20%左右[4]，因此早期诊断及治疗具有重要意义。我们在长期的临床实践中发现大多数食管癌患者大便干燥，甚至十余日一行，这种肠道环境是势必存在菌群的改变。目前已有大量研究证实肠道菌群与结直肠癌、胃癌、肝癌等多种肿瘤密切相关，可作为诊断、治疗及预后的参考评估指标[5-9]，但关于食管癌患者肠道菌群特征的研究较少。本研究旨在探索食管鳞癌患者肠道菌群特征，期望筛选出特异性差异的肠菌，为食管癌的早诊及治疗提供循证依据。

1 材料与方法

1.1 一般资料

本研究对象来自 2022 年 4 月-2022 年 8 月期间就诊于河北医科大学第四医院的食管鳞状细胞癌患者 35 例作为食管癌组（EC 组）。同时期招募在医院体检的健康志愿者 35 例作为对照组（DZ 组）。本研究已通过河北医科大学第四医院医学伦理委员会审核。

1.2 食管癌患者纳入排除标准

诊断标准：诊断参照 CSCO《食管癌诊疗指南》（2022 年）[10]

食管癌组纳入标准：1）经组织病理学诊断为食管鳞状细胞癌；2）年龄 18～75 岁；3）无其他恶性肿瘤个人史；4）未经任何抗肿瘤治疗（如手术、放化疗、免疫治疗等）；5）签署知情同意书。对照组纳入标准：1）年龄 18～75 岁；2）无恶性肿瘤病史；3）签署知情同意书。排除标准：1）2 周内有感染性疾病、抗生素治疗史及益生菌服用史；2）有精神疾病及无完全民事行为能力；3）有严重心血管疾病及肠道疾病等（如炎症性肠病、肠易激综合征等）

1.3 一般资料及标本收集

临床资料收集：收集两组符合纳排标准入组人群的一般资料，包括性别、年龄、饮酒史、吸烟史及临床分期。

标本采集：收集两组人群的新鲜粪便标本，嘱受试者将粪便排泄到干净的容器中，避免尿液、马桶壁等对粪使样本的污染，用无菌勺对排泄中后部的粪便挖取 1g 左右，放入做好标记的冻存管中，立即置于液氮中猝灭约 1min，后将冻存管放入-80℃冰箱保存，两组各收集 35 例受试者粪便标本。

1.4 肠道菌群检测与分析

将收集的 70 例粪便样本提取基因组 DNA，应用 16SV34 区域特异引物进行 PCR 扩增（上游引物 CCTAYGGGRBGCASCAG,下游引物 GGACTACNNGGGTATCTAAT）。将磁珠纯化的 PCR 产物，根据浓度进行等量混样，混匀后使用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，然后对目的条带用胶回收试剂盒回收纯化产物。使用建库试剂盒构建文库，文库定量检查合格后，使用 NovaSeq6000 进行上机测序。通过对测序序列进行拼接，同时对序列质量进行质控和过滤，以 97%的一致性将序列聚类成为分类操作单元（Operational Taxonomic Units，OTUs），然后对 OTUs 序列与 Silva138 数据库进行物种注释。根据物种注释情况，进一步分析 Alpha 多样性与 Beta 多样性，并进行组间差异的比较，揭示两组群落结构的差异特征。

1.5 统计分析

采用 SPSS22.0 统计软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以（ $\bar{x}\pm s$）表示，如方差齐则进行 T-test 检验，方差不齐则应用秩和检验。计数资料采用卡方检验，显著性筛选的阈值为 $P<0.05$。

2 结果

2.1 人群基本特征

EC 组男性及女性分别为 21 例及 14 例，对照组分别为 18 例及 17 例；平均年龄段食管癌组分别为<50 岁 4 例、50-60 岁 11 例、>60 岁 20 例；对照组分别为<50 岁 7 例、50-60 岁 15 例、>60 岁 13 例。食管癌组吸烟史分别为从不吸烟 10 例、偶尔吸烟 14 例、经常吸烟 11 例；对照组分别为从不吸烟 15 例、偶尔吸烟 8 例、经常吸烟 12 例。食管癌组饮酒史分别为从不饮酒 9 例、偶尔饮酒 17 例、经常饮酒 9 例；对照组从不饮酒 15 例、偶尔饮酒 13 例、经常饮酒 7 例。食管癌组分期分别为 I 期 3 例、II 期 6 例、III 期 17 例、IV 期 9 例。两组人群在性别、年龄、吸烟及饮酒史等方面无明显差异（$P>0.05$）。

2.2 两组人群肠菌群落 OUTs 分析

对获得的有效数据进行分析共得到 3602 个 OTUs，再对 OTU 序列进行物种注释，共有 52 个 OTUs 注释到物种门水平（Phylum），756 个 OTUs 注释到物种属水平（Genus）。基于 OTUs 注释结果比较食管癌患者与对照组人群肠道菌群结构的差异。选则两组在门水平和属水平上最大丰度排名前 10 的物种，绘制物种相对丰度柱形累加图，由图可见在门水平上两组人群样本以厚壁菌门（Firmicutes）、放线菌门（Actinobacteriota）、变形菌门（Proteobacteria）、拟杆菌门（Bacteroidota）、疣微菌门（Verrucomicrobiota）为主。其中部分物种丰度存在明显差异，与 DZ 组相比，EC 组中拟杆菌门及放线菌门丰度比例升高，而厚壁菌门、疣微菌门丰度比例明显降低（见图 1A）。属水平上两组人群以双歧杆菌属（Bifidobacterium）、大肠杆菌-志贺菌属（Escherichia-Shigella）、栖粪杆菌属（Faecalibacterium）、拟杆菌属（Bacteroides）、普雷沃菌属（Prevotella）、克雷伯氏菌属（Klebsiella）、链球菌属（Streptococcus）、经黏液真杆菌属（Blautia）、艾克曼菌属（Akkermansia）、戴阿利斯特杆菌属（Dialister）为主，与对照组相比，食管癌组中栖粪杆菌属丰度比例明显降低（见图 1B）。

2.3 两组人群肠道菌群 Alpha 多样性组间差异分析

2.3.1 物种累积箱形图分析

物种累积箱形图是描述随着样本量的增加物种多样性是否增加的分析，其结果反映持续抽样下新 OTU 出现的速率，主要用于判断样本量的选择是否充分合理。由图可见物种累积箱形图位置趋于平缓，两组样本量充分，测序数据量合理，随着样本量的增加肠菌物种并不会显著增多(见图 2)。

2.3.2 Alpha 多样性组间差异分析

Alpha 多样性主要与丰富度及多样性有关，香农指数（shannon）指数和辛普森指数（simpson）指数用于描述菌群多样性，Chao1 指数和 ACE 指数用于描述菌群丰富度，Goods_coverage 指数描

述测序深度。选取以上指数分析两组样本中物种分布的多样性和丰富度，并直观展示测序深度，结果显示各指数均无统计学差异，Goods_coverage 指数两组测序深度均达 99%以上，数据量充足（*P* 均>0.05，见表 1、图 3）。

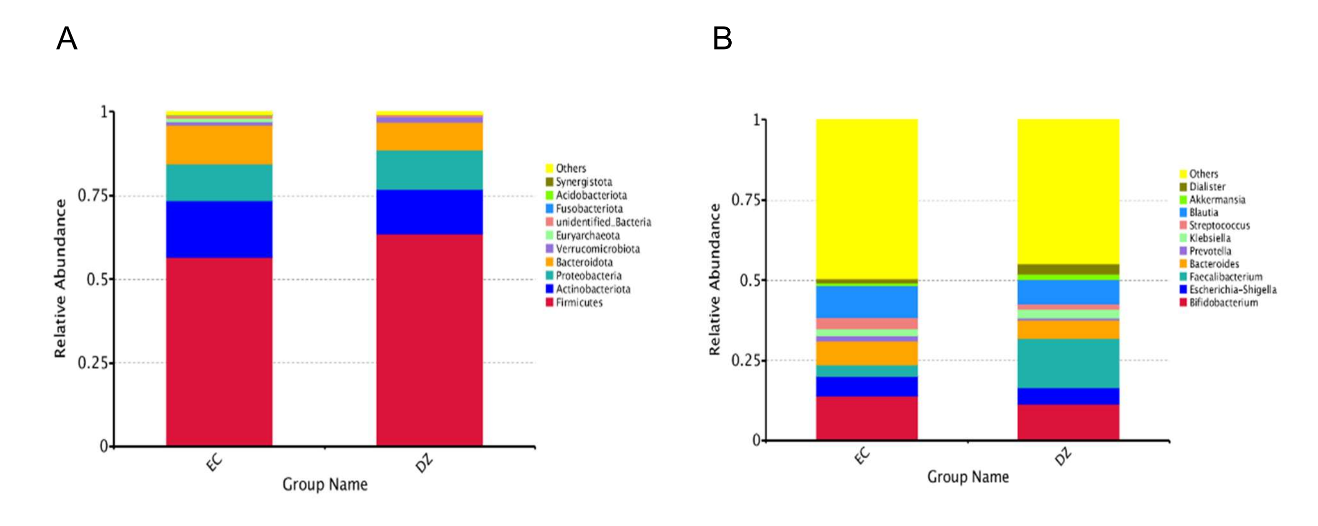


图 1 两组人群肠道菌群门及属水平物种相对丰度柱状图

Figure 1 Relative abundance of species at phylum and genus level of intestinal flora between two groups of people

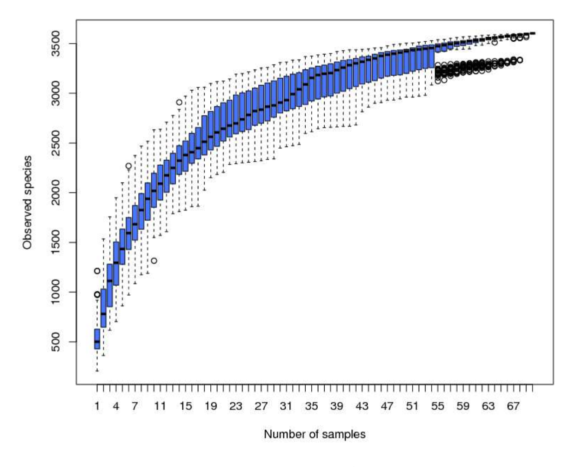


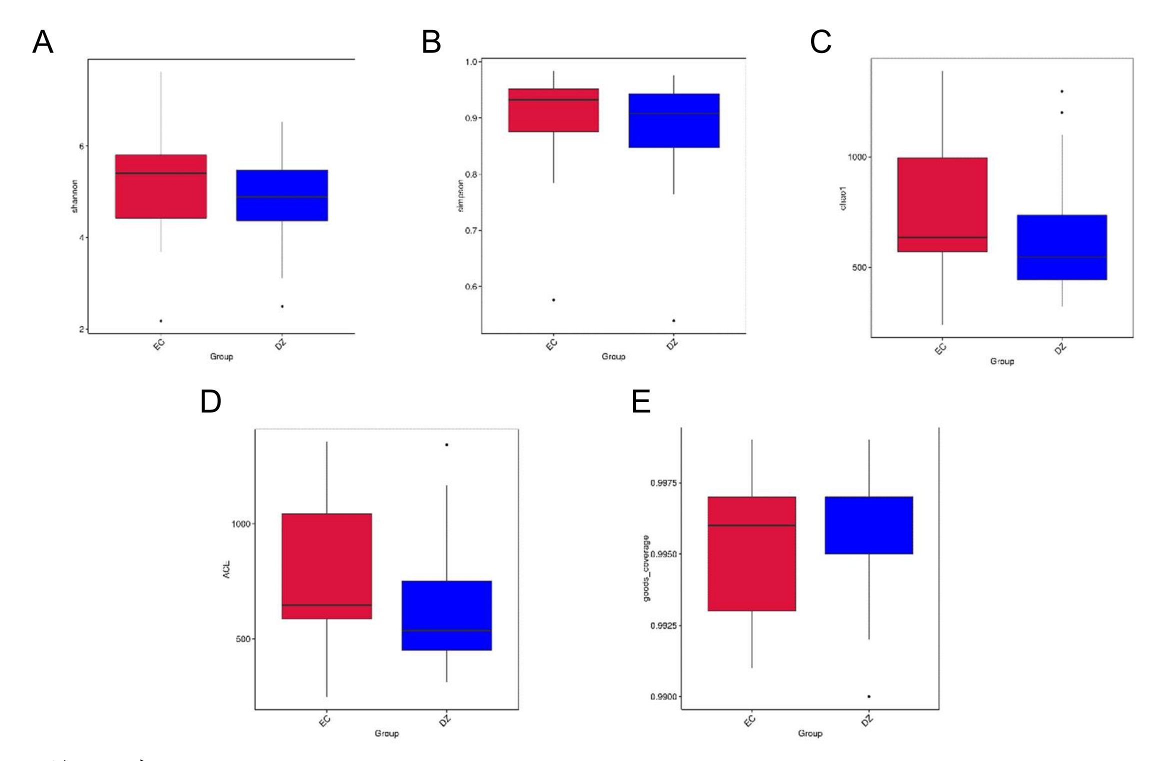
图 2 物种累积箱形图

Figure 2 Species accumulation boxplot

表 1 两组人群 Alpha 多样性指数组间差异分析

Table 1 Analysis of the difference between the two groups in Alpha diversity index of people

分组	shannon	simpson	chao1	ACE	goods_coverage
EC 组	5.179	0.904	724.533	739.655	0.995
DZ 组	4.831	0.886	619.408	629.617	0.996
*p*_value(wilcox)	0.167	0.213	0.089	0.076	0.252



注：A 为 shannon 指数，B 为 simpson 指数，C 为 chao1 指数，D 为 ACE 指数，E 为 goods_ coverage 指数

图 3 两组人群 Alpha 多样性指数组间差异箱形图

Figure 3 Box chart of differences in Alpha diversity index between two groups of people

2.4 两组人群肠道菌群 Beta 多样性组间差异分析

Beta 多样性分析是对两组样品间的菌群构成情况进行比较分析。主坐标分析（PCoA）是常用的 Beta 多样性分析方法，其基于 Unweighted Unifrac 距离来进行分析，样本间距离越远代表样本间多样性差异越大。PCoA 图结果显示，EC 组与 DZ 组样本整体上相距较远，两组样本间多样性差异较大。同时通过 t 检验，绘制 Beta 多样性组间差异分析的箱形图，两组菌群存在显著性差异（**P<0.01, 见图 4）

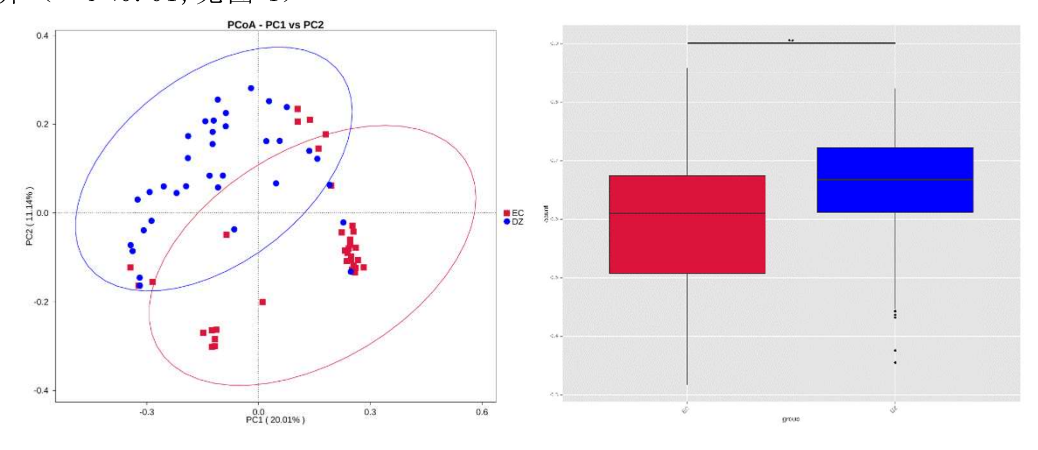


图 4 两组人群 Beta 多样性 PCoA 分析及组间差异箱形图

Figure 4 PCoA analysis and box chart of Beta diversity between two groups of people

2.5 两组人群菌群差异物种分析

2.5.1 组间与组内差异性分析

非参数检验 Anosim 分析用于检验组间差异是否大于组内，判断实验分组是否存在意义。结果显示两组菌群差异组间大于组内，差异有统计学意义（R=0.158，*P*<0.01，见图 5）。

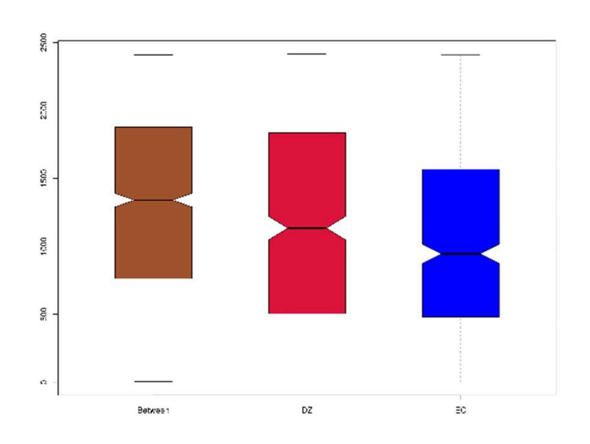


图 5　两组人群肠道菌群 Anosim 组间差异分析

Figure 5　Analysis of similarities（ANOSIM）of intestinal flora between two groups of people

2.5.2 两组人群属水平菌群差异物种分析

两组人群肠道菌群在属水平共有 16 类菌属的丰度存在明显差异。两组相比相对丰度较高的前 8 位肠菌中，EC 组中栖粪杆菌属（Faecalibacterium）、罗斯氏菌属（Roseburia）、柠檬酸杆菌（Citrobacter）等丰度低于 DZ 组；乳酸杆菌（Lactobacillus）、罗姆布茨菌(Romboutsia)、瘤胃球菌属组（Ruminococcus_torques_group）、肠杆菌（Intestinibacter）、土杆菌属（Turicibacter）的丰度明显高于 DZ 组（*P* 均<0.05，见图 6）。食管癌组中乳酸杆菌属丰度高于对照组，经询问采样前补充肠道益生菌者要多于对照组（食管癌组：对照组=11 例：6 例）所以本研究将乳酸杆菌作为干扰因素，不纳入组间差异分析。

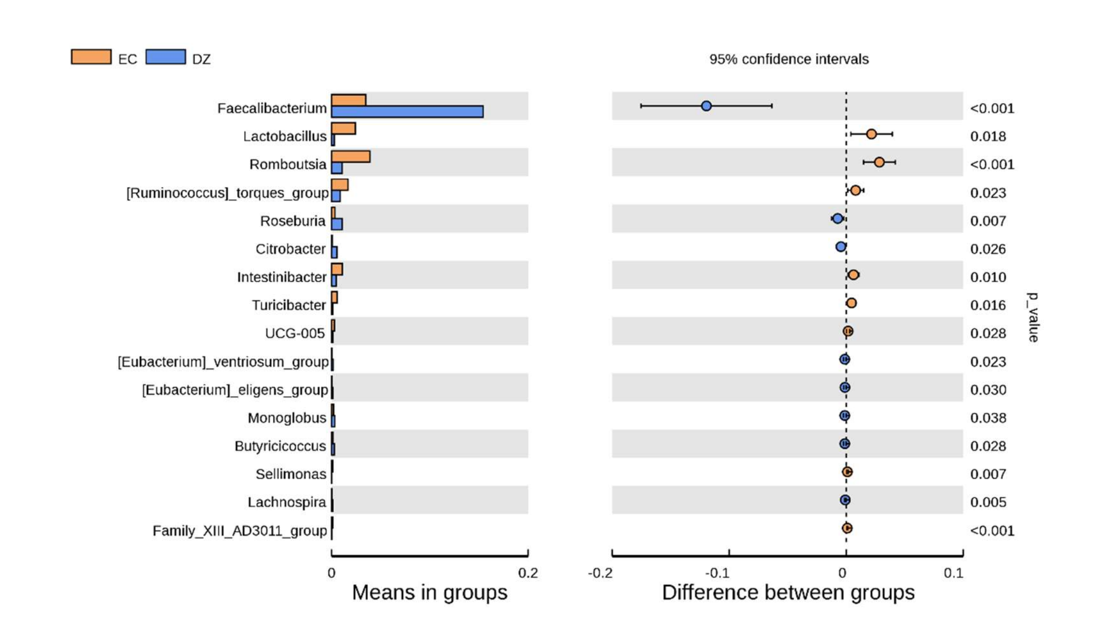


图 6 两组人群肠道菌群属水平组间物种差异分析

Figure 6　Differential species analysis of intestinal flora at the genus level between two groups of people

2.5.3 两组人群肠道菌群 LEfSe 分析

LEfSe 分析可展现不同组中丰度有显著差异的物种，用于分析每个物种丰度对差异效果影响的大小。通过柱状图及进化分支图结果显示，两组共有 14 种有显著差异肠菌，其中乳杆菌目(o-Lactobacillales),芽孢杆菌纲(c-Bacilli)，消化链球菌科(f-Peptostreptococcaceae)， o-Peptostreptococcales-Tissierellales,罗姆布茨菌属(g-Romboutsia),s-Rombutsia-ilealis 在食管癌组丰度明显升高。韦荣氏球菌科(f-veillonellaceae)，厚壁菌纲（c-Negativicutes），月形单胞菌目(o-veillonellales-selenomonadales)，厚壁菌门(p-firmicutes)，普氏栖粪杆菌(又名普拉梭菌 s-faecalibacterium-prausnitzii)，颤螺旋菌目(o-oscillospirales),瘤胃菌科(f-ruminococcaccaceae),栖粪杆菌属(g-faeculibacterium)在对照组人群中丰度明显升高。在属及种水平上与 DZ 组相比，EC 组中栖粪杆菌属及普拉梭菌丰度明显降低；罗姆布茨菌及 Rombutsia-ilealis 丰度明显升高，是具有重要鉴别意义的 Biomarker（$P<0.05$，见图 7）。

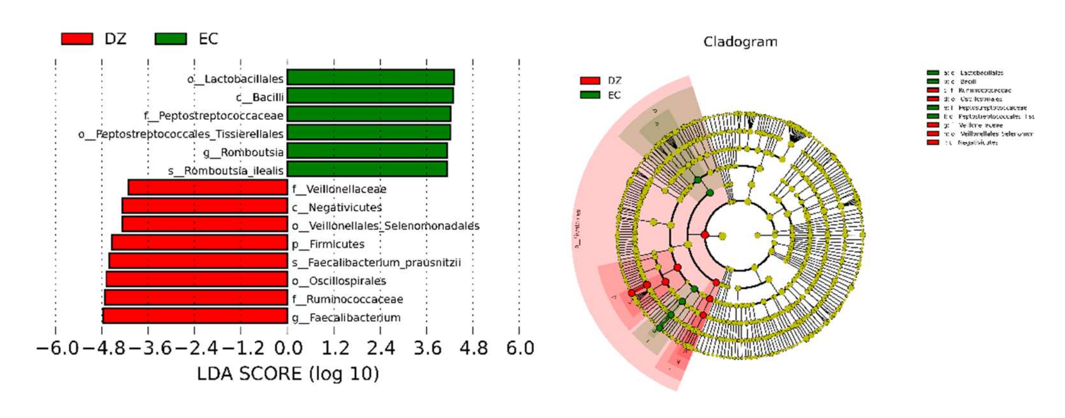


图 7 两组人群肠道菌群 LEfSe 分析柱状图及进化分支图

Figure 7 Histogram of LEfSe analysis and evolutionary branch diagram of intestinal flora between two groups of people

3 讨论

正常人体肠道内约有 100 万亿个肠菌，总重约为 1-2kg，被称为最大共生体[11]。这些共生肠菌在人体内发挥了重要作用，如消化吸收、免疫调控、维持肠道黏膜屏障及肠道稳态等[12]。已知正常人体内肠菌在门水平上厚壁菌门和拟杆菌门约占 90%，放线菌门、拟杆菌门和梭杆菌门等约占 10%[13]。既往大量研究发现肠道菌群通过多种方式影响多种肿瘤的发生发展[5-9]。

本研究中两组人群肠道菌群 Alpha 多样性即菌群物种丰富度未见明显差异，而 Beta 多样性即两组菌群物种结构存在明显差异。两组以厚壁菌门、放线菌门、变形菌门、拟杆菌门、疣微菌门为主。与 DZ 组人群相比，EC 组中拟杆菌门及放线菌门丰度比例升高，而厚壁菌门、疣微菌门比例明显降低。两组人群肠道菌群 T-test 检验结果在属水平共有 16 类菌属的丰度存在明显差异，相对丰度较高的前几位肠菌中，在 EC 组中栖粪杆菌属、罗斯氏菌属、柠檬酸杆菌等丰度低于 DZ 组；罗姆布茨菌、瘤胃球菌属组、肠杆菌、土杆菌属等丰度明显高于 DZ 组。LEfSe 分析结果显示 14 种肠道菌群丰度有差异，其中在属种水平上，栖粪杆菌属、普拉梭菌在 EC 组中丰度明显降低，而罗姆布茨菌属及 Romboutsia ilealis 在 EC 组中丰度明显升高。

栖粪杆菌属是本研究中表达丰度较高且变化最明显的菌属，这可能是对食管癌发生具有重要意义的差异菌属。研究发现栖粪杆菌属在乳腺癌患者中表达丰度明显降低，与代谢物磷胆碱结合，可能成为乳腺癌检测的新方法[14]。另外发表在 Science 上的一项研究也发现，粪杆菌属在 PD-L1 治疗无效的黑色素瘤患者中丰富较低，可能通过上调 CD8+T 等免疫细胞和抗原呈递相关分子促进抗 PD-1 肿瘤治疗有关[15]。栖粪杆菌属中最著名的普氏栖粪杆菌，又名普拉梭菌，约占正常人体粪便菌群总数的 5-15%，是人体最重要的肠菌之一，也是丁酸的重要生产者之一[16-17]。有

研究发现，与健康人群相比，在结肠癌患者粪便中普拉梭菌含量显著降低，该研究还推测可能与其产生的丁酸盐减少有关[18]。同时体外研究发现普拉梭菌及其上清具有抑制结肠癌细胞增殖及促进凋亡等作用[19]。普拉梭菌还能够抑制乳腺癌细胞中白细胞介素-6 的分泌和 Janus 激酶 2/信号转导和转录激活因子 3 的磷酸化，从而抑制乳腺癌增殖和侵袭，促进其凋亡[14]。栖粪杆菌属及普拉梭菌的变化均与本研究结果一致。

ZHANG[20]等及 SEOL[21]等研究发现罗姆布茨菌属在结直肠癌及胃癌患者中丰度明显升高，与本研究一致。其分类中的 Romboutsia ilealis 被认为是葡萄糖代谢的潜在恶化剂，是 2 型糖尿病的危险因素[22]，但与肿瘤的关系研究很少。Wang[23]等研究发现，罗斯氏菌属在结肠癌患者中大量减少，可能通过其产生的丁酸盐阻断核因子 κ B 通路的活化有关。ZHENG[24]等发现瘤胃球菌属在肺癌患者肠道中含量较高。肿瘤坏死因子可以直接杀伤和抑制肿瘤细胞，Lida 等[25]研究发现瘤胃球菌属与肿瘤坏死因子分泌呈正相关，以上研究结果均表明肠道菌群的改变与肿瘤的发生发展及治疗密切相关。其中瘤胃球菌属的变化趋势与我们课题组之前研究的食管癌原位模型小鼠的肠道菌群改变相同[26]，可以相互验证。但其中部分差异菌属不同，因为人类肠道菌群受饮食、疾病、药物等外界影响因素较多，如以往研究表明乳酸杆菌属于益生菌，而本次研究中乳酸杆菌在食管癌患者中要高于对照组人群，这与以往研究结果不太一致，通过询问患者生活饮食，受试者虽近 2 周未服用益生菌，但有 11 例食管癌患者有长期服用乳酸菌奶制品史，多于对照组，这些提示我们需要进一步研究证实，并在今后研究肠道菌群时要延长停用益生菌的时间。

本研究同时存在些不足之处，首先入组的患者均为我院就诊患者，地域性单一，样本量偏小，可能结果需要多地区大样本的临床研究验证。其次我们应用的 16S rDNA 测序主要研究群落的多样性、物种构成及其之间的进化关系，但该测序分析不是宏基因组测序，所以不能进行基因和功能等层面的深入研究。再次目前研究只是揭示了食管癌患者与正常人群肠道菌群的变化，但并未从机制上进行深入的研究验证。最后对于标本采样前抗生素、益生菌的停用时间目前无统一标准，但根据本研究应适度延长，具体时限有待进一步明确认定。以上不足之处也将是我们下一步的研究重点。

参考文献

[1]Sung H,Ferlay J,Siegel R L,et al.Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J].CA Cancer J Clin,2021,71(3):209-249.DOI:10.3322/caac.21660.

[2]刘宗超，李哲轩，张阳，等.2020 全球癌症统计报告解读[J].肿瘤综合治疗电子杂志,2021,7(02):1-14.DOI:10.12151/JMCM.2021.02-01.

[3]Sakai M,Kitagawa Y,Saeki H,et al.Fruit and vegetable consumption and risk of esophageal cancer in the Asian region: a systematic review and meta-analysis[J].Esophagus,2022,19(1),27-38.DOI:10.1007/s10388-021-00882-6.

[4]Chen Y,Huang K N,Ding X Y,et al.Magnolol inhibits growth and induces apoptosis in esophagus cancer KYSE-150 cell lines via the MAP kinase pathway[J].J Thorac Dis,2019,11(7):3030-3038. DOI:10.21037/jtd.2019.07.46

[5]Lv J,Jia Y,Li J,et al.Gegen Qinlian decoction enhances the effect of PD-1 blockade in colorectal cancer with microsatellite stability by remodelling the gut microbiota and the tumour microenvironment [J].Cell Death & Disease, 2019,10(6):415. DOI:10.1038/s41419-019-1638-6.

[6]Eun C S,Kim B K,Han D S,et al.Differences in Gastric Mucosal Microbiota Profiling in Patients with Chronic Gastritis,Intestinal Metaplasia,and Gastric Cancer Using Pyrosequencing Methods[J].Helicobacter,2015,19(6): 407-416. DOI:10.1111/hel.12145.

[7]Ma C,Han M,Heinrich B,et al.Gut microbiome - mediated bile acid metabolism regulates

liver cancer via NKT cells[J].Science,2018,360(6391):eaan5931. DOI:10.1126/science.aan5931.
[8]Routy B,Le Chatelier E ,Derosa L,et al.Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors[J].Science,2018, 359(6371):91-97. DOI:10.1126/science.aan3706.
[9]Gopalakrishnan V,Spencer C N,Nezi L,et al.Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients[J].Science,2018, 359(6371):eaan4236. DOI:10.1126/science.aan4236.
[10]中国临床肿瘤学会指南工作委员会. 食管癌诊疗指南(2022 版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2022:10-42.
[11]Zhang X Y,Zhao S W,Song X B,et al.Inhibition effect of glycyrrhiza polysaccharide (GCP) on tumor growth through regulation of the gut microbiota composition[J].J Pharmacol Sci,2018,137(4):324-332. DOI:10.1016/j.jphs. 2018.03.006.
[12]Meng C T,Bai C M, Brown T D,et al.Human gut microbiota and gastrointestinal cancer[J].Genomics Proteomics Bioinformatics,2018,16(1): 33-49. DOI:10.1016/j.gpb.2017.06.002.
[13]李宁宁,白春梅,赵林,等.消化道肿瘤患者与健康人群粪便菌群差异分析[J].中国医学科学院学报,2019,41(05):636-645.DOI:10.3881/j.issn.1000-503X.11372.
[14]Ma J, Sun L, Liu Y, et al. Alter between gut bacteria and blood metabolites and the anti-tumor effects of Faecalibacterium prausnitzii in breast cancer[J]. BMC Microbiology,2020,20(1). DOI:10.1186/s12866-020-01739-1.
[15]Gopalakrishnan V,Spencer C N, Nezi L,et al.Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients[J]. Science, 2017, 359(6371):eaan4236. DOI:10.1126/science.aan4236.
[16]Fonseca-Silva T,Oliveira M V,Fraga C A,et al.DNMT3B(C46359T) polymorphisms and immunoexpression of DNMT3b and DNMT1 proteins in oral lichen planus[J]. Pathobiology,2012,79(1):18-23. DOI:10.1159/000330171.
[17]Heinken A,Khan M T,Paglia G,et al.Functional Metabolic Map of Faecalibacterium prausnitzii, a Beneficial Human Gut Microbe[J].Journal of Bacteriology,2014,196(18),3289-3302. DOI:10.1128/JB.01780-14.
[18]Lopez-Siles M, Martinez-Medina M, R Surís-Valls, et al. Changes in the Abundance of Faecalibacterium prausnitzii Phylogroups I and II in the Intestinal Mucosa of Inflammatory Bowel Disease and Patients with Colorectal Cancer[J].Inflammatory bowel diseases,2016,22(1):28-41.DOI:10.1097/mib. 0000000000000590.
[19]张敏,张涛,谢丽娟,等.Faecalibacterium prausnitzii 对大肠癌细胞增殖和凋亡的影响[J].现代生物医学进展,2015,15(25):4801-4804+4818. DOI:10.13241 /j.cnki.pmb.2015.25.001.
[20]ZHANG Z C,CAO H Y,SONG N,et al. Long-term hexavalent chromium exposure facilitates colorectal cancer in mice associated with changes in gut microbiota composition[J]. Food Chem Toxicol,2020,138:111237. DOI:10.1016/ j.fct.2020.111237.
[21]SEOL M,LEE Y R,KIM K M, et al.The difference of the gut microbiota of gastric cancer in relation to Helicobacter pylori negativity and positivity [J].J Clin Oncol,2019,37(4):10. DOI:10.1200/jco.2019.37.4_suppl.10.
[22]Newman N K,Monnier P M,Rodrigues R R,et al.Host response to cholestyramine can be mediated by the gut microbiota. Cold Spring Harbor Laboratory,2020.

DOI:10.1101/2020.12.08.416487
[23]Wang T T,Cai G X,Qiu Y P,et al.Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers[J].ISMEJ,2012, 6(2):320-329. DOI:10.1038/ismej.2011.109.
[24] ZHENG Y, FANG Z, XUE Y, et al. Specific gut microbiome signature predicts the early-stage lung cancer[J]. Gut Microbes,2020,11(4):11-13.
[25]Lida N, Dzutsev A, Stewart C A, et al. Commensal Bacteria Control Cancer Response to Therapy by Modulating the Tumor Microenvironment[J]. Science, 2013,342(6161):967-970. DOI:10.1126/science.1240527.
[26]张玉双,于富洋,吴忠冰,等.食管鳞癌原位模型小鼠肠道菌群分析[J].中国全科医学,2022,25(08):945-951. DOI:10.12114/j.issn.1007-9572.2021.01.501.